

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. April 2003 (24.04.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/033700 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/11,
A61K 31/713, C12N 15/88, C07K 14/18, 14/82

KREUTZER, Roland [DE/DE]; Glotzdorf 26, 95466
Weidenberg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/11432

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstr. 49 A,
91052 Erlangen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
11. Oktober 2002 (11.10.2002)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 50 187.0 12. Oktober 2001 (12.10.2001) DE
101 55 280.7 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE
101 58 411.3 29. November 2001 (29.11.2001) DE
101 60 151.4 7. Dezember 2001 (07.12.2001) DE
101 63 098.0 20. Dezember 2001 (20.12.2001) DE
PCT/EP02/00151 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP
PCT/EP02/00152 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): RIBOPHARMA AG [DE/DE]; Fritz-Hornschuch-
Str. 9, 95326 Kulmbach (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
--- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JOHN, Matthias
[DE/DE]; Kapellenstr. 12, 96103 Hallstadt (DE).
LIMMER, Stefan [DE/DE]; Gutenbergstr. 9, 95512
Neudrossenfeld (DE). VORNLOCHER, Hans-Peter
[DE/DE]; Lise-Meitner-Platz 4, 95448 Bayreuth (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 03/033700 A1

(54) Title: METHOD FOR INHIBITING THE REPLICATION OF VIRUSES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HEMMUNG DER REPLIKATION VON VIREN

(57) Abstract: The invention relates to a method for inhibiting the replication of viruses which contain an untranslated region at the 3' end of the viral genome (3'-UTR), whereby a structure is modified within the 3'-UTR by means of a short double-stranded ribonucleic acid (RNA) or an antisense oligonucleotide.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Replikation von Viren mit einer am 3'-Ende des Virus-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR), bei welchem eine Struktur innerhalb der 3'-UTR unter Verwendung einer kurzen doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) oder eines Antisinn Oligonukleotids geändert wird.

Am

Verfahren zur Hemmung der Replikation von Viren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, eine Verwendung und ein
5 Medikament zur Hemmung der Replikation von Viren.

Die Erfindung betrifft insbesondere das Gebiet der Hemmung
von (+)-Strang-RNA-Viren, wie Hepatitis-C-Viren.

10 Das Genom von (+)-Strang-RNA-Viren ist ein einzelsträngiges
kodierendes RNA-Molekül (+ssRNA). Zu diesen Viren gehören
die Familien Picornaviridae, Flaviviridae, Togaviridae, Co-
ronaviridae und Caliciviridae. Ein bedeutender Vertreter der
Familie Flaviviridae ist das Hepatitis-C-Virus (HCV). Es
15 verursacht Hepatitis C, eine entzündliche Erkrankung der Le-
ber, die mit Leberfibrose und Leberkrebs verbunden sein
kann. Ein erheblicher Teil der Hepatitis-C-Erkrankungen ver-
läuft chronisch. Die Infektion mit HCV erfolgt vor allem pa-
renteral, beispielsweise durch Bluttransfusion oder durch
20 Gabe von Medikamenten aus Blutprodukten.

Das Hepatitis-C-Virus wurde 1989 entdeckt (Choo et al., Sci-
ence 244: 359, 1989). Die Replikation des kodierenden (+)-
Strangs wird durch die Erzeugung eines replikativen antisense
25 bzw. (-)-Strangs vermittelt. Vom (-)-Strang werden mehre-
re Kopien des kodierenden (+)-Strangs abgeschrieben. Das
HCV-Genom, welches ca. 9600 Nukleotide umfasst, wird zu ei-
nem Polyprotein mit ca. 3000 Aminosäuren translatiert (Lein-
bach et al., Virology, 204: 163, 1994). Virale und zelluläre
30 Proteasen schneiden aus diesem Polyprotein die funktionsfä-
higen Viruseiweiße heraus. Sowohl am 5'-Ende, als auch am
3'-Ende des HCV-Genoms, befinden sich hochkonservierte Se-
quenzen, welche ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstrukturen
ausbilden. Diese Sequenzen besitzen für die Translation und
35 die Replikation der HCV-Viren eine große Bedeutung, werden

aber bei der Eiweißsynthese nicht translatiert. Diese Sequenzen werden als 5'-UTR und 3'-UTR bezeichnet (UTR = untranslated region).

- 5 HCV ist durch eine hohe genetische Variabilität gekennzeichnet. Die hohe Mutationsrate der viralen Nukleinsäure hat zur Entwicklung mehrerer HCV-Genotypen geführt, die eine vergleichsweise geringe Sequenzidentität von etwa 70 % aufweisen (Simmonds et al., J. Gen Virol., 75: 1053, 1994). Die
- 10 Häufigkeit der einzelnen Genotypen ist regional unterschiedlich. Darüber hinaus besteht eine Abhängigkeit von der Art der Übertragung, wobei eine gleichzeitige Ansteckung mit verschiedenen HVC-Genomen möglich ist. Die hohe Variabilität des HCV erschwert die Behandlung von Erkrankungen erheblich.
- 15 Eine Hepatitis-C-Erkrankung umfasst in der Regel mehrere Phasen. Die erste akute Phase beginnt mit der Ansteckung des Patienten mit HCV. Es wird ein Entzündungsvorgang ausgelöst, der durch einen etwa vier Wochen nach der Ansteckung beginnenden Anstieg der Leberenzymkonzentration im Blutserum gekennzeichnet ist. Vor dem Anstieg der Leberenzymkonzentration ist es möglich, im Blutserum des Patienten HCV-RNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachzuweisen. In diesem
- 20 Stadium zeigen nur etwa 25 % der Patienten Symptome wie Gelbsucht, so dass bei 75 % die Infektion unerkannt bleibt. Auch wenn die akute HCV-Infektion eine nicht-maligne Erkrankung ist, führt die Infektion in etwa 80 % zu einer chronischen Lebererkrankung, die durch einen dauerhaften Anstieg des Alaninaminotransferase-Niveaus im Serum gekennzeichnet
- 25 ist. Aus einer chronischen HCV-Erkrankung entwickelt sich bei mehr als 20 % der Patienten eine Leberzirrhose und bei einer nicht unerheblichen Zahl ein malignes Hepatom. Die Lebenserwartung nach der Diagnose eines malignen Hepatoms beträgt in der Regel zwölf Monate.

Bisher bekannte therapeutische Verfahren zur Behandlung von HCV-Infektionen haben nur einen begrenzten Erfolg gehabt und führten bei der Mehrzahl der Patienten zu keiner anhaltenden Besserung. Die heute vorherrschende Therapieform verwendet
5 spezielle Zytokine, die als Interferone bezeichnet werden. Vorzugsweise wird Interferon- α (IFN-alpha) eingesetzt, das nach 6-monatiger Therapie bei etwa 50 % der Patienten zu einer Verringerung der Alaninaminotransferase-Werte im Serum führt. Allerdings steigen diese Werte bei vielen Patienten
10 nach dem Ende der Behandlung wieder an. Überdies ist die Behandlung mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen verbunden (Dusheiko et al, J. Viral Hepatitis, 1: 3, 1994). Trotzdem ist die Interferon-Therapie bisher das wichtigste Verfahren, um das Risiko der Entstehung von Leberzirrhose und eines ma-
15 lignen Hepatoms zu verringern. Ein Impfschutz gegen HCV ist bisher nicht möglich.

Es sind deshalb Versuche unternommen worden, die virale Proteintranslation unter Einsatz spezieller Ribozyme zu hemmen.
20 Beispielsweise beschreiben Welch et al. (Gene Therapy, 3 (11): 994, 1996) zwei vektorexprimierte Hairpin-Ribozyme, die gegen HCV gerichtet sind. Lieber et al. (Virology, 70 (12): 8782, 1996) beschreiben die Beseitigung von HCV-RNA in infizierten menschlichen Hepatozyten durch Adenovirus-vermittelte
25 Expression von bestimmten Hammerhead-Ribozymen. WO 99/55847 offenbart Ribozyme, die HCV-RNA-Spezies in konservierten Sequenzen in 5'- und 3'-nicht-kodierenden Bereichen und am 5'-Ende des für das Kernprotein kodierenden Bereichs schneiden können. Auch das US-Patent Nr. 5,610,054 offenbart enzymatische
30 Nukleinsäuremoleküle, welche die Replikation von HCV inhibieren können. Der therapeutische Erfolg dieser Verfahren bei der Behandlung von HCV-Infektionen ist jedoch noch nicht erwiesen. Ein generelles Problem besteht darin, dass die enzymatische Aktivität von Ribozymen vergleichsweise gering
35 ist. Es besteht ein Bedürfnis, weitere Verfahren zur effizien-

enten Behandlung von HCV-Infektionen bzw. Virusinfektionen zu entwickeln.

Aus Fire et. al (Nature, 391: 806, 1998) ist es bekannt,
5 dass dsRNA, deren einer Strang abschnittsweise komplementär zu einem zu hemmenden Gen eines Fadenwurms ist, die Expression dieses Gens mit einer hohen Wirksamkeit hemmt. Es wird die Auffassung vertreten, dass die besondere Wirksamkeit der verwendeten dsRNA in Zellen des Fadenwurms nicht auf dem AntiSinn-Prinzip beruht, sondern möglicherweise auf katalyti-
10 sche Eigenschaften der dsRNA oder mit dsRNA assoziierten Enzyme zurückzuführen ist. Dieses Verfahren wird als RNA-Interferenz bezeichnet und wird beispielsweise in WO 00/44895 zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens verwendet.
15 det.

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere ein Verfahren und eine Verwendung angegeben werden, welche die Replikation von Viren wirksam hemmen. Darüber hinaus soll ein Medikament und eine dsRNA angegeben werden, mit dem eine besonders wirksame Hemmung der Replikation von Viren bewirkbar ist.
20

25 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 15, 16, 33 und 49 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 14, 17 bis 32, 34 bis 48 und 50 bis 62.

30 Nach Maßgabe der Erfindung ist verfahrensseitig vorgesehen, dass eine Struktur innerhalb der 3'-UTR unter Verwendung einer kurzen doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) oder eines Antisinn-Oligonukleotids geändert wird, wobei ein Strang S1 der dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid abschnittsweise

oder vollständig komplementär zur 3'-UTR-Sequenz der Viren ist.

Unter dem Begriff "Struktur" wird hier die Primär-, Sekundär-
5 oder Tertiärstruktur einer aus Nukleinsäure gebildeten Sequenz verstanden. Eine Änderung der Struktur liegt z. B. vor, wenn die Primärsequenz geschnitten oder durch Deletionen oder Insertionen verändert wird. Eine Änderung kann auch die Sekundärstruktur, d.h. die Basenpaarung, betreffen. Schließlich
10 ist auch eine Änderung der räumlichen Struktur, d.h. der Tertiärstruktur, möglich. Unter einer kurzen dsRNA wird eine dsRNA verstanden, welche aus weniger als 50 Basenpaaren gebildet ist. Das Antisinn-Oligonukleotid kann sowohl aus DNA als auch aus RNA gebildet sein. Es kann komplementär zu einem
15 Bereich der 3'-UTR sein und eine Struktur innerhalb der 3'-UTR ändern, indem es damit hybridisiert. Da die Replikation von Viren in der Regel in einer Zelle stattfindet, muss die dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid zur Hemmung der Replikation im Allgemeinen in die jeweilige Zelle eingeführt bzw.
20 von der Zelle aufgenommen werden. Das Aufnehmen kann durch die Zelle selbst erfolgen. Es kann aber auch durch Hilfsstoffe oder Hilfsmittel vermittelt werden. Unter der 3'-UTR wird entweder der gesamte nicht-translatierte Bereich am 3'-Ende des Virus-Genoms oder ein Teil dieses Bereichs verstanden.

25 Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass durch eine Änderung der Struktur innerhalb der 3'-UTR die Replikation des Virus-Genoms gehemmt oder blockiert werden kann und dass dies besonders effektiv unter Verwendung einer dsRNA oder eines
30 Antisinn-Oligonukleotids erreicht werden kann. Damit ist es möglich, Viren mit einer 3'-UTR besonders effizient zu bekämpfen.

Nach einer Ausgestaltung kann ein die 3'-UTR bildender Sequenzabschnitt geschnitten werden. Das Schneiden kann dabei
35

durch die dsRNA und die in der Zelle vorhandenen Enzyme bewirkt werden. Die 3'-UTR kann hochkonserviert sein. Die Änderung der Struktur wird zweckmäßigerweise in einem besonders hoch konservierten Bereich der 3'-UTR bewirkt. Das steigert
5 weiter die Effizienz des Verfahrens, weil viele Virus-Genome, insbesondere das HCV-Genom, eine hohe Sequenzvariabilität aufweisen. Die Auswahl eines hochkonservierten Bereichs eröffnet daher die Möglichkeit der Hemmung der Replikation einer größeren Zahl von Viren als in einem weniger konservierten
10 ten oder variablen Bereich.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, den Sequenzabschnitt unter Verwendung einer kurzen doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zu ändern, insbesondere zu schneiden
15 oder dessen Schneiden durch die dsRNA zu bewirken. Ein Strang S1 der dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid kann abschnittsweise oder vollständig komplementär zur 3'-UTR-Sequenz sein. Darunter wird verstanden, dass entweder ein Abschnitt des Antisinn-Oligonukleotids bzw. des Strangs S1 der
20 dsRNA oder der gesamte Strang S1 der dsRNA bzw. das gesamte Antisinn-Oligonukleotid komplementär zu einem Abschnitt der 3'-UTR oder zur vollständigen 3'-UTR ist.

Nach einer weiteren Ausgestaltung kann die dsRNA zumindest
25 abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet sein. Ein Ende der dsRNA, vorzugsweise beide Enden, können glatt ausgebildet sein. Glatt bedeutet, dass das Ende eines Strangs nicht über das Ende des anderen Strangs der dsRNA hinausragt, d.h. keinen Überhang bildet. Zumindest ein Strang, insbesondere der
30 Strang S1, kann am 3'-Ende einen Überhang haben, der aus 1 bis 3, vorzugsweise 2, Nukleotiden bestehen kann. Die vorerwähnten Merkmale beeinflussen die Plasmastabilität der dsRNA. dsRNA mit zumindest einem glatten Ende weist eine höhere Plasmastabilität als dsRNA mit, insbesondere beidseitigen,
35 Überhängen auf, d.h. sie wird in Plasma bzw. Blut weniger

schnell abgebaut. Darüber hinaus ist die Stabilität einer solchen dsRNA im Zellinneren größer als diejenige einer dsRNA mit Überhängen. Die Stabilität, insbesondere die Plasmastabilität, kann also durch die jeweilige Konstruktion der dsRNA an die jeweiligen Erfordernisse angepasst werden. Einzelsträngige Überhänge verringern die Stabilität der dsRNA in Blut, Serum und Zellen und verstärken gleichzeitig die replikationshemmende Wirkung der dsRNA. Besonders effektiv ist die Hemmung der Replikation, wenn die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist. Das andere Ende ist dann bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass zur Verstärkung der replikationshemmenden Wirkung der dsRNA ein Überhang an einem Ende der dsRNA ausreichend ist, ohne dabei die Stabilität in einem solchen Maße zu erniedrigen wie durch zwei Überhänge. Eine dsRNA mit nur einem Überhang hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blut, Serum und Zellen als hinreichend beständig und besonders wirksam erwiesen.

Weiterhin hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn ein zumindest abschnittsweise zur 3'-UTR-Sequenz komplementärer Bereich der dsRNA bzw. des Strangs S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare bzw. Basen umfasst. Die dsRNA weist zweckmäßigerweise eine Länge von weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare auf. Damit entspricht die Länge der dsRNA im Wesentlichen der Länge des komplementären Bereichs. Eine solche dsRNA kann besonders preisgünstig hergestellt werden.

Zweckmäßigerweise ist das Virus-Genom das Genom eines (+)-Strang-RNA-Virus, insbesondere eines Hepatitis-C-Virus.

Die dsRNA kann in einer Lösung, insbesondere in einer phosphatgepufferten Salzlösung, vorliegen. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, dass eine lediglich in einer solchen Lösung gelöste dsRNA von Zellen aufgenommen
5 wird und die Replikation der Viren hemmt, ohne dass die dsRNA dazu in einem besonderen Vehikel verpackt sein muss. Die dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid kann auch von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsoid umschlossen vorliegen. Dadurch kann
10 die Aufnahme in Zellen erleichtert sein. Darüber hinaus wird dadurch die Möglichkeit gegeben, die dsRNA durch bestimmte Oberflächenstrukturen gezielt zu bestimmten Zellen zu steuern, so dass vor allem diese Zellen die dsRNA aufnehmen. Die dsRNA kann einen Sinn-Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4
15 und einen Antisinn-Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 aufweisen. Das Antisinn-Oligonukleotid kann einen Strang mit der Sequenz SEQ ID NO: 12 oder SEQ ID NO: 13 aufweisen. "SEQ ID NO" bezeichnet jeweils die Nummer einer Sequenz im anliegenden Sequenzprotokoll.

20 Erfindungsgemäß ist weiter die Verwendung von kurzen doppelsträngigen Ribonukleinsäuren (dsRNA) oder eines Antisinn-Oligonukleotids zur Hemmung der Replikation von Viren mit einer am 3'-Ende des Virus-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR) durch Änderung einer Struktur innerhalb der 3'-UTR zur Behandlung einer Virusinfektion vorgesehen.
25 Weiterhin ist die Verwendung einer solchen dsRNA oder eines solchen Antisinn-Oligonukleotids zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Replikation von Viren mit einer
30 am 3'-Ende des Virus-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR) durch Änderung einer Struktur innerhalb der 3'-UTR vorgesehen. Bei beiden Verwendungen ist ein Strang S1 der dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid abschnittsweise oder vollständig komplementär zur 3'-UTR-Sequenz der Viren.

Die dsRNA kann in einer Zubereitung vorliegen, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion, geeignet ist. Solche Zubereitungen sind aus der Pharmazie bekannt. Die dsRNA kann dabei in einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, vorliegen.

Vorzugsweise liegt die dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsid umschlossen vor. Die dsRNA kann oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenöser oder intraperitonealer Infusion oder Injektion, verabreicht werden. Vorzugsweise wird die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, pro kg Körpergewicht und Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht.

Zur Lösung der Aufgabe wird ferner ein Medikament vorgeschlagen, bei dem zur Änderung der Struktur innerhalb der 3'-UTR eine kurze doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) oder ein Antisinn-Oligonukleotid enthalten ist, wobei ein Strang S1 der dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid abschnittsweise oder vollständig komplementär zur 3'-UTR-Sequenz der Viren ist. Ferner betrifft die Erfindung eine dsRNA mit einem Strang S1, welcher abschnittsweise oder vollständig zu einer am 3'-Ende eines Virus-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR) komplementär ist.

Wegen der weiteren vorteilhaften Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Verwendung und des erfindungsgemäßen Medikaments wird auf die zum Verfahren beschriebenen Merkmale verwiesen, welche sinngemäß auch hier Anwendung finden können.

Nachfolgend wird anhand der Figuren ein Ausführungsbeispiel der Erfindung näher erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 den relevanten Sequenzbereich aus Plasmid p2
5 und die N-terminale Aminosäuresequenz des entsprechenden Reporterproteins,
- Fig. 2 den relevanten Sequenzbereich aus Plasmid p3
10 und die N-terminale Aminosäuresequenz des entsprechenden Reporterproteins,
- Fig. 3 die dsRNA HCV1-2 (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5) gegenüber der HCV-Sequenz einer mittels der Plasmide p2 und p3 gebildeten mRNA (SEQ ID NO 15),
15
- Fig. 4 die dsRNA GAL1-2 (SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7) gegenüber einer dem β -Gal-Gen entsprechenden mRNA-Sequenz (SEQ ID NO 16) (Positivkontrolle),
- 20 Fig. 5 die dsRNA HCV3-4 (SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9), welche keinen Bezug zu exprimierten Genen aufweist (Negativkontrolle),
- Fig. 6 die dsRNA K22 (SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11),
25 welche keinen Bezug zu exprimierten Genen aufweist (Negativkontrolle),
- Fig. 7 die Antisinn-Oligonukleotide HCVPT01 (SEQ ID NO 12), HCVPT02 (SEQ ID NO 13) und HCVPT03 (SEQ ID NO 14) gegenüber der HCV-Sequenz einer mittels des Plasmids p3 gebildeten mRNA (SEQ ID NO 15),
30
- Fig. 8 Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen der dsRNAs HCV1-2, GAL1-2 und HCV3-4 auf die Akti-

vität der mittels des Plasmids p2 exprimierten β -Galaktosidase,

Fig. 9 Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen der
5 dsRNAs HCV1-2, GAL1-2 und HCV3-4 auf die Aktivität der mittels des Plasmids p3 exprimierten β -Galaktosidase und

Fig. 10 Wirkung der Antisinn-Oligonukleotide HCVPT01,
10 HCVPT02, HCVPT03, der dsRNAs HCV1-2, GAL1-2, K22 und einer Kontroll-dsRNA auf die Aktivität der mittels des Plasmids p3 exprimierten β -Galaktosidase.

15 Ausführungsbeispiel

Molekularbiologische Analysen mit Hepatitis-C-Viren in Zellkultur sind sehr schwierig. Der Effekt der RNA-Interferenz und von Antisinn-RNA auf virale Gensequenzen wird an Hand
20 nicht-pathogener Ersatzsysteme untersucht. Als nicht-pathogenes Reportersystem zum Studium der RNA-Interferenz und der Wirkung von Antisinn-Oligonukleotiden wurde die Sequenz Nr. 1 des Sequenzprotokolls vor ein für E. coli- β -Galaktosidase kodierendes Gen eines Plasmids kloniert. Die Sequenz Nr. 1 entspricht einer 24 Nukleotide umfassenden Sequenz aus einem
25 hochkonservierten Bereich des 3'-UTR des HCV-Genoms. Nach Transfektion des Plasmids in humane HuH-7-Leberzellen wird die Sequenz als Teil einer für β -Galaktosidase kodierenden mRNA transkribiert. Die den 24 Nukleotiden entsprechende Sequenz der mRNA ist dann identisch mit der Sequenz des HCV-
30 Genoms. Sie wurde als Zielsequenz verwendet.

Herstellung von Plasmid p2 und p3 als Reportersystem

Das E. coli- β -Galaktosidase (β -Gal) -Gen wurde aus dem kommerziell erhältlichen Expressionsvektor p β Gal-Control (BD Biosciences Clontech, Tullastrasse 4, D-69126 Heidelberg, Deutschland, Gene Accession Number U13186; Nukleotid 280-3429) isoliert.

In Plasmid p2 ist die HCV-Sequenz Teil eines Fusionsgens. Die HCV-Sequenz ist Teil des offenen Leserahmens der für β -Galaktosidase kodierenden Sequenz, so dass auch die HCV-Sequenz als Teil eines Fusionsproteins exprimiert wird. Fig. 1 zeigt den relevanten Sequenzabschnitt von Plasmid p2 gemäß Sequenz Nr. 2 des Sequenzprotokolls. Die HCV-Sequenz ist kursiv dargestellt. Der Beginn des β -Gal-Gens (einschließlich 6 Nukleotide der Kozak-Sequenz vor dem Codon ATG) ist unterstrichen. Die N-terminale Aminosäuresequenz des Fusionsproteins HCV- β -Galaktosidase ist unter der DNA-Sequenz aufgeführt.

Auch in Plasmid p3 ist die HCV-Sequenz Teil eines Fusionsgens. Die HCV-Sequenz befindet sich aber außerhalb des offenen Leserahmens der für β -Galaktosidase kodierenden Sequenz, so dass die HCV-Sequenz nicht als Teil eines Fusionsproteins exprimiert wird. Fig. 2 zeigt den relevanten Sequenzabschnitt von Plasmid p3 gemäß Sequenz Nr. 3 des Sequenzprotokolls. Die HCV-Sequenz ist kursiv dargestellt. Der Beginn des β -Gal-Gens (einschließlich 6 Nukleotide der Kozak-Sequenz vor dem Startcodon ATG) ist unterstrichen. Die N-terminale Aminosäuresequenz der exprimierten β -Galaktosidase ist unter der DNA-Sequenz aufgeführt.

Die so generierten Fusionsgene wurden in das kommerziell erhältliche Expressionsplasmid pcDNA3.1 (+) kloniert (Invitrogen, Life Technologies, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether-Str. 10, D-76131 Karlsruhe, Deutschland, Katalognum-

mer V790-20). Dieses Plasmid enthält ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Neomycin. Es verleiht den damit transfizierten HuH-7-Zellen eine Resistenz gegen das Neomycin-Analogon G418, so dass in Gegenwart von G418 nur HuH-7-Zellen selektioniert werden, welche das Plasmidgenom und damit das Reporter-
5 gen stabil in ihr Genom aufgenommen haben.

Als Kontrollplasmid für die Transfektionseffizienz wurde das kommerziell erhältliche Plasmid pGL3-ctrl (Promega GmbH,
10 High-Tech-Park, Schildkrötstr. 15, D-68199 Mannheim, Deutschland, Gene-Accession-Number U47296) verwendet. Es kodiert und exprimiert das Gen der "Firefly Luciferase".

Verwendete dsRNA-Oligonukleotide

15 Zur Durchführung der RNA-Interferenz wurden drei kurze, doppelsträngige Ribonukleinsäuren (dsRNA) verwendet. Diese dsRNAs bestehen aus jeweils 2 kurzen Oligoribonukleotiden, welche über fast den gesamten Sequenzbereich zueinander komplementär sind. An beiden 3'-Enden der Oligoribonukleotide
20 besitzen jeweils zwei Nukleotide keine Partner und bilden deshalb in der dsRNA Überhänge.

Die Sequenz des einen Oligoribonukleotids ist identisch mit der Zielsequenz der mRNA. Dieses Oligonukleotid wird deshalb
25 als Sinn-Strang bezeichnet. Die Sequenz des anderen Oligonukleotids ist zu der Zielsequenz der mRNA komplementär. Dieses Oligonukleotid wird deshalb als Antisinn-Strang bezeichnet.

In Fig. 3 ist das als HCV1-2 bezeichnete doppelsträngige Oligoribonukleotid gegenüber der HCV-Sequenz der mittels der
30 Plasmide p2 und p3 gebildeten mRNA dargestellt. Dabei entsprechen die mit Großbuchstaben dargestellten Nukleotide der HCV-Sequenz in den Plasmiden p2 und p3. HCV1-2 besteht aus dem Sinn-Strang HCV 1 und dem Antisinn-Strang HCV 2, wobei
35 jeweils zwei Nukleotide an den 3'-Enden der Stränge keinen

Partner aufweisen. Der in Sequenz Nr. 4 des Sequenzprotokolls dargestellte Sinn-Strang (HCV 1) weist nahezu dieselbe Nukleotidsequenz wie die HCV-Sequenz einer mittels der Plasmide p2 bzw. p3 gebildeten mRNA auf. Am 5'-Ende fehlen drei Nukleotide der HCV-Sequenz und am 3'-Ende befinden sich zwei Nukleotide, die nicht Bestandteil der HCV-Sequenz sind. Der in Sequenz Nr. 5 des Sequenzprotokolls dargestellte Antisinn-Strang (HCV 2) ist abgesehen von den zwei Nukleotiden am 3'-Ende komplementär zu HCV 1 und damit auch zu der HCV-Sequenz einer mittels der Plasmide p2 bzw. p3 gebildeten mRNA. Die HCV-Sequenz entspricht einer 3'-nicht-translatierten Region des HCV-Genoms.

Zur positiven Kontrolle wurde eine als GAL1-2 bezeichnete dsRNA verwendet. Diese ist in Fig. 4 gegenüber einer dem β -Gal-Gen der Plasmide p2 und p3 entsprechenden mRNA-Sequenz (in Fig. 4 als mRNA bezeichnet) dargestellt. GAL1-2 besteht aus dem Sinn-Strang Gal 1 und dem Antisinn-Strang Gal 2, wobei jeweils zwei Nukleotide an den 3'-Enden der Stränge keinen Partner aufweisen. Der in Sequenz Nr. 6 des Sequenzprotokolls dargestellte Sinn-Strang (Gal 1) weist nahezu dieselbe Nukleotidsequenz wie die dem β -Gal-Gen entsprechende mRNA-Sequenz auf. Der in Sequenz Nr. 7 des Sequenzprotokolls dargestellte Antisinn-Strang (Gal 2) ist abgesehen von den zwei Nukleotiden am 3'-Ende komplementär zu Gal 1 und damit auch zu der dem β -Gal-Gen entsprechenden mRNA-Sequenz.

Zur negativen Kontrolle wurde in einem Teil der Versuche eine als HCV3-4 bezeichnete dsRNA verwendet, die keinen Bezug zu hier exprimierten Genen hat (Fig. 5). HCV3-4 besteht aus dem Sinn-Strang HCV 3 und dem Antisinn-Strang HCV 4, wobei jeweils zwei Nukleotide an den 3'-Enden der Stränge keinen Partner aufweisen. Der in Sequenz Nr. 8 des Sequenzprotokolls dargestellte Sinn-Strang (HCV 3) weist nahezu keine Ähnlichkeit zur mittels der Plasmide p2 und p3 gebildeten mRNA auf

und ist deshalb ohne Bezug zu den exprimierten Genen. Der in
Sequenz Nr. 9 des Sequenzprotokolls dargestellte Antisinn-
Strang (HCV 4) ist abgesehen von den zwei Nukleotiden am 3'-
Ende komplementär zu HCV 3 und ist deshalb ebenfalls ohne Be-
5 zug zur gebildeten mRNA.

Als Negativkontrolle wurde in einem anderen Teil der Versuche
eine als K22 bezeichnete dsRNA verwendet, die ebenfalls kei-
nen Bezug zu einem hier exprimierten Gen aufweist (Fig. 6).
10 Die Sequenzen der beiden die dsRNA bildenden Oligoribonukleo-
tide sind in den Sequenzen Nr. 10 und 11 des Sequenzproto-
kolls dargestellt.

Zur Durchführung der Experimente mit Antisinn-Oligoribonu-
15 kleotiden wurden drei jeweils 21 Nukleotide lange DNA-Anti-
sinn-Oligonukleotide als Phosphothioate eingesetzt. Die Oli-
gonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH, Lena-Christ-
Str. 44, D-82152 Martinsried, Deutschland bezogen. Sie werden
hier als HCVPTO1, HCVPTO2 und HCVPTO3 bezeichnet. HCVPTO1 und
20 HCVPTO2 sind zu unterschiedlichen Bereichen der mittels des
Plasmids p3 gebildeten HCV-mRNA-Sequenz komplementär. HCVPTO3
ist als Negativkontrolle ohne Bezug zur Zielsequenz. HCVPTO1,
HCVPTO2 und HCVPTO3 sind gegenüber der HCV-mRNA-Sequenz in
Fig. 7 dargestellt.

25

Für den Nachweis der RNA Interferenz wurden Experimente mit
Leberzelllinien des Typs HuH-7 durchgeführt (Nakabayashi et
al. 1982). Diese Zelllinie kann durch HCV infiziert werden
und dient zur Kultivierung dieser Viren. Die Zellen wurden in
30 DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium) mit 10 % fötalem
Kälberserum (FCS) kultiviert.

35

a) Versuche zur RNA-InterferenzTransfektion

Zur Vorbereitung einer Transfektion wurden 2×10^4 Zellen pro
5 Vertiefung einer 96-well Zellkulturplatte ausgesät. $3 \mu\text{g}$
Plasmid p2 bzw. Plasmid p3 wurden mit $1 \mu\text{g}$ Kontrollplasmid
pGL3-ctrl. gemischt. Es wurden $0,25 \mu\text{g}$ dieser Plasmidgemische pro Vertiefung zur Transfektion eingesetzt. Etwa 24
Stunden nach dem Aussäen der Zellen wurden die Reporterplas-
10 mide p2/pGL3-ctrl und p3/pGL3-ctrl zusammen mit dsRNA in
HuH-7 transfiziert. Die Menge an transfizierter DNA pro Ver-
tiefung war konstant.

Die Menge an dsRNA wurde in abnehmenden Konzentrationen von
15 400 nmol/l bis $12,5 \text{ nmol/l}$ (in Bezug auf $110 \mu\text{l}$ Transfektionsvolumen) zu den Plasmidgemischen zugegeben. Die Ausgangskonzentration der dsRNAs HCV1-2, GAL1-2 und des unspezifischen HCV3-4 in der jeweiligen Stammlösung betrug jeweils
20 $20 \mu\text{mol/l}$. Die dsRNAs wurden durch Mischen mit gleichen Volumina Annealing buffer (AB, 100 mmol/l NaCl , $20 \text{ mmol/l Na-Phosphat}$, pH 6,8) stufenweise auf die Endkonzentration verdünnt.

Für eine Endkonzentration von 400 nmol/l wurden bei einer
25 Stammkonzentration an dsRNA von $20 \mu\text{mol/l}$ $2,2 \mu\text{l}$ Stammlösung auf $110 \mu\text{l}$ Transfektionsvolumen pro 1 Well bzw. $6,6 \mu\text{l}$ Stammlösung auf $330 \mu\text{l}$ Transfektionsvolumen pro 1 Well verwendet. Die Verdünnungsstufen wurden gemäß Tabelle 1 hergestellt.

Tabelle 1

Herstellung von Verdünnungsstufen der dsRNA

Lösung-Nr.	Ausgangslösung	Konzentration der Ausgangslösung ($\mu\text{mol/l}$)	Menge der Ausgangslösung (μl)	Menge an zuge-setztem AB (μl)	Endkonzentration* (nmol/l)
1	Stammlösung	20	14,0	-	400
2	Lösung 1	10	7,0	7,0	200
3	Lösung 2	5	7,0	7,0	100
4	Lösung 3	2,5	7,0	7,0	50
5	Lösung 4	1,25	7,0	7,0	25
6	Lösung 5	0,62	7,0	7,0	12,5

* Endkonzentration unter Verwendung von 6,6 μl der jeweiligen
 5 Lösung auf 330 μl Transfektionsvolumen

Plasmide und dsRNA wurden co-transfiziert. Als Transfektionsagens wurde Gene Porter 2 (PeQLab, Carl-Thiersch-Str. 2B, D-91052 Erlangen, Deutschland, Katalognummer 13-T202007)
 10 eingesetzt. Jede Co-Transfektion wurde dreifach durchgeführt.

Für drei Vertiefungen in 96-well-Platten wurde ein Gemisch aus 2,0 μl eines Plasmidgemisches aus Plasmid p2 und Kontrollplasmid pGL3 (0,3875 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 3 : 1), 6,6 μl dsRNA (20, 10, 5, 2,5, 12,5 bzw. 0,62 $\mu\text{mol/l}$) und 16,4 μl DNA-Diluent B (wird zusammen mit Gene Porter 2 von der Firma PeQLab geliefert) hergestellt. Dieses Gemisch wurde mit einem Gemisch aus
 15 6,0 μl Gene Porter 2 und 19 μl Serumfreiem Medium vermischt.
 20 Das Gesamtvolumen des so erhaltenen Gemisches betrug 50 μl , von denen 16,5 μl zu jeweils 2×10^4 HuH-7 in 100 μl Medium gegeben wurden.

Weiterhin wurde ein Gemisch aus 2,0 µl eines Plasmidgemisches aus Plasmid p3 und Kontrollplasmid pGL3 (0,3875 µg/µl; 3 : 1), 6,6 µl dsRNA (20, 10, 5, 2,5, 12,5 bzw. 0,62 µmol/l) und 16,4 µl DNA-Diluent B hergestellt. Dieses Gemisch wurde mit einem Gemisch aus 6,0 µl Gene Porter 2 und 19 µl Serum-freiem Medium vermischt. Das Gesamtvolumen des so erhaltenen Gemischs betrug 50 µl, von denen 16,5 µl zu jeweils 2×10^4 HuH-7 in 100 µl Medium gegeben wurden.

Die transfizierten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Einen Tag nach der Transfektion wurden 35 µl frisches Medium pro Vertiefung zugegeben und die Zellen weitere 24 h inkubiert. Dann erfolgte der Aufschluss der Zellen.

15 Verwendete Nachweismethoden

Der Effekt der dsRNA auf die Expression der Reportergene wurde durch Quantifizierung der β-Galaktosidase- und Luciferase-Aktivität mittels Chemilumineszenz bestimmt. Dazu wurden Lysate mittels dem Tropix-Lysepuffer der Firma Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 USA; Cat. No. BD100LP gemäß den Herstellervorschriften hergestellt.

Zur Quantifizierung der β-Galaktosidase-Aktivität wurden 2 µl Lysat pro Analyse sowie das Substrat Galcto-Star (Applied Biosystems, Tropix, Katalognummer BM100S) gemäß den Herstellervorschriften verwendet. Zur Quantifizierung der Luciferase-Aktivität wurden 5 µl Lysat pro Analyse sowie das Substrat Luciferin (Applied Biosystems, Tropix, Katalognummer BC100L) gemäß den Herstellervorschriften verwendet. Die Lumineszenz ist jeweils in dem Luminometer Berthold Sirius der Firma Berthold Detection Systems GmbH, Bleichstrasse 56-68, D-75173 Pforzheim, Deutschland, gemessen worden.

Ergebnisse

Pro Transfektionsansatz wurden drei 96-well-Vertiefungen ausgewertet, wobei jeweils eine Messung für β -Galaktosidase und eine Messung für Luciferase erfolgte. Der Quotient aus
5 relativen Lichteinheiten (RLU) für β -Galaktosidase und den relativen Lichteinheiten für Luciferase wurde berechnet. Für diese drei Einzelwerte wurde ein Mittelwert ermittelt. Der Mittelwert für p2/pGL3- bzw. p3/pGL3-transfizierte Zellen ohne dsRNA wurde willkürlich als 1,0 definiert. Die unter
10 dsRNA-Einfluss veränderten Werte werden im Verhältnis zu 1,0 aufgetragen (siehe Fig. 8 und 9), d.h. ein Wert von 0,6 entspricht einer Hemmung der β -Galaktosidase-Aktivität um 40 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

15 Aus Fig. 8 ist zu erkennen, dass bei einer Co-Transfektion von sequenzspezifischer dsRNA mit Plasmid p2 eine Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgt. Die dsRNAs HCV1-2 und GAL1-2 hemmen die β -Galaktosidase mit vergleichbarer Effizienz. Bei 400 nmol/l und 200 mol/l dsRNA im Transfektionsvolu-
20 men sinkt die Aktivität der β -Galaktosidase auf 40 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Mit abnehmender Konzentration der dsRNA lässt der hemmende Effekt nach. Die Kontroll-dsRNA HCV3-4 führt über den gesamten Konzentrationsbereich zu keiner Abnahme an β -Galaktosidase-Aktivität im Lysat.

25 Bei einer Co-Transfektion von sequenzspezifischer dsRNA HCV1-2 mit Plasmid p3 ist ebenfalls eine Reduktion der β -Galaktosidase-Expression nachweisbar (Fig. 9). Die dsRNAs HCV1-2 und GAL1-2 hemmen die β -Galaktosidase-Aktivität mit ver-
30 gleichbarer Effizienz. Bei 400 nmol/l und 200 nmol/l dsRNA im Transfektionsvolumen sinkt die Aktivität der β -Galaktosidase auf etwa 20 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Mit abnehmender Konzentration der dsRNA lässt der hemmende Effekt nach. Die Kontroll-dsRNA HCV3-4 zeigt über
35 den gesamten Konzentrationsbereich eine schwache Hemmung der

β -Galaktosidase-Aktivität auf etwa 70 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

In Gegenwart von dsRNA HCV1-2 war somit sowohl für Plasmid p2 als auch Plasmid p3 eine deutliche Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität erkennbar. Vergleichbare Effekte zeigte dsRNA GAL1-2 (positive Kontrolle). Die zweite Kontroll-dsRNA HCV3-4 führte zu keiner bzw. einer deutlich geringeren Hemmung der β -Galaktosidase-Aktivität.

10

Die Expression und/oder die Stabilität der RNA konnte im beschriebenen Experiment durch dsRNA stark gemindert werden. Dies gelang auch für HCV-Zielsequenzen außerhalb des offenen Leserahmens, welches der Situation für den natürlichen 3'-UTR Bereich von HCV entspricht.

15

b) Versuche mit Antisinn-DNA-Oligonukleotiden

Zur Vorbereitung der Experimente wurde p3 mittels LipofectaminePLUS (GIBCO BRL Life Technologies, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether-Str. 10, D-76131 Karlsruhe, Deutschland) in HuH-7-Zellen stabil transfiziert. Hierfür wurden 2×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 96-well-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium abgezogen und durch $50 \mu\text{l}$ serumfreies Medium (DMEM) ersetzt. Das Transfektionsgemisch bestand aus $0,2 \mu\text{g}$ p3, $16,7 \mu\text{l}$ DMEM, $2 \mu\text{l}$ PLUS Reagenz und $1 \mu\text{l}$ Lipofectamine Reagenz. Die Transfektion wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach 3 h wurde das Transfektionsmedium durch $150 \mu\text{l}$ Vollmedium (DMEM + 10 % Fötale Kälberserum) ersetzt. Nach 48 h wurden die Zellen in Vertiefungen einer 12-well-Zellkulturplatte überführt und in Gegenwart von $400 \mu\text{g/ml}$ G418 (Amersham Biosciences, Munzinger Str. 9, D-79111 Freiburg, Deutschland) in Vollmedium kultiviert. Wachsende Zellhaufen wurden regelmäßig entnommen und in neue Vertiefungen einer 12-well-Zellkulturplatte überführt. Aus

35

diesen wurden nach 14 - 21 Tagen wachsende Zellen in neuen Vertiefungen vereinzelt und bis zum Ende der Selektion in Gegenwart von 400 µg/ml G418 kultiviert. Nach etwa drei Vereinzellungen wurde mit Hilfe von Enzymmessungen die Aktivität an β-Galaktosidase wie unten beschrieben bestimmt. Des Weiteren wurden mit X-Gal-Färbungen die Zahl der Galaktosidase-exprimierenden Zellen festgestellt. Hierzu wurde das Medium abgezogen und die Zellen in Vertiefung einer 96-well-Zellkulturplatte über Nacht in 100 µl X-Gal-Lösung (10 mmol/l Na-Phosphat pH 7,0, 1 mmol/l MgCl₂, 150 mmol/l NaCl, 3,3 mmol/l K₄Fe(CN)₆·3H₂O, 3,3 mmol/l K₃Fe(CN)₆, 0,2 % X-Gal) (X-Gal von PeQLab, Erlangen, Deutschland; alle anderen Chemikalien von SIGMA, Grünwalder Weg 30, D-82024 Taufkirchen, Deutschland) gefärbt. Der beste Klon wurde als "HuH-7 blue" bezeichnet und für die Experimente eingesetzt.

Transfektion mit dsRNA und Antisinn-DNA-Oligonukleotiden

Zur Vorbereitung einer Transfektion wurden 2 x 10E4 Zellen HuH-7 blue in 100 µl DMEM + 10 % FCS pro Vertiefung einer 96-well-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die dsRNA und die Antisinn-DNA-Oligonukleotide transfiziert. Für diese Transfektionen wurde Fugene 6 (Roche Applied Sciences, Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim, Deutschland; Katalognummer 1814443) eingesetzt. Je 5 Vertiefungen mit HuH7 blue Zellen wurden nicht behandelt. Von den dsRNAs HCV 1-2, GAL 1-2 und K22 wurden jeweils Stammlösungen mit einer Konzentration von 20 µmol/l hergestellt. Von dieser Stammlösung sind jeweils 1,6 µl mit 0,9 µl Fugene 6 und 108 µl DMEM gemischt worden. Die dsRNA liegt dann in einer Konzentration von 50 nmol/l vor. Jeweils 5 Vertiefungen einer 96-well-Zellkulturplatte wurden mit je 20 µl dieses Ansatzes transfiziert.

Von den Antisinn-DNA-Oligonukleotiden HCVPT01, HCVPT02 und HCVPT03 sind jeweils Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 µmol/l hergestellt worden. Von diesen Stammlösungen

sind jeweils 1,2 μ l mit 2,4 μ l Fugene 6 und 108 μ l DMEM gemischt worden. Die dsRNA liegt dann in einer Konzentration von 200 nmol/l vor. Jeweils 5 Vertiefungen einer 96-well-Zellkulturplatte wurden mit je 20 μ l dieses Ansatzes transfiziert.

Nachweismethoden

Der Effekt der dsRNA-Oligonukleotide und Antisinn-DNA-Oligonukleotide auf die Expression der Reportergene wurde durch Quantifizierung der β -Galaktosidase-Aktivität durch Chemilumineszenz bestimmt. Dazu wurden Lysate mittels dem Tropix-Lysepuffer der Firma Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 USA; Katalognummer BD100LP gemäß den Herstellervorschriften hergestellt. Die Chemilumineszenzmessung wurde wie folgt durchgeführt:

Pro Reaktionsgefäß wurden 5 μ l Lysat vorgelegt und auf 30 μ l mit β -Gal-Assay-Puffer (1 ml 1 mol/l Na-Phosphat-Puffer, pH 8,0, 10 μ l 1 mol/l $MgCl_2$, 10 μ l 1,25 mg/ml Galakton (Tropix GC020, Applied Biosystems), 9 ml entionisiertes Wasser) aufgefüllt. Nach 30 Minuten Inkubation ist mit β -Gal-Stopp-Mix (1 ml 2 mol/l NaOH, 250 μ l 2,5 % Emerald Enhancer (Applied Biosystems, Tropix, LAY250), 8,75 ml entionisiertes Wasser) auf 100 μ l aufgefüllt, gründlich gemischt und sofort am Luminometer gemessen worden. Wenn nicht anders angegeben, stammen die Reagenzien von der Firma SIGMA. Die Lumineszenz ist jeweils in dem Luminometer Berthold Sirius der Firma Berthold Detection Systems GmbH, Bleichstr. 56-68, 75173 Pforzheim, Deutschland, gemessen worden. Pro Transfektionsansatz werden je 5 Vertiefungen einer 96-well-Zellkulturplatte ausgewertet. Dazu wird jeweils die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt und ein Mittelwert der 5 Einzelwerte ermittelt. Der Mittelwert für nicht-transfizierte Zellen wird willkürlich als 1,0 definiert. Die Mittelwerte für transfizierte Zellen werden im Verhältnis zu dem Mittelwert für nicht-transfizierte Zellen

aufgetragen. Ein Wert von beispielsweise 0,6 entspricht einer Hemmung der β -Galaktosidase-Aktivität um 40% im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Ergebnisse sind in Fig. 10 dargestellt.

5

Ergebnisse

Bei der Transfektion von sequenzspezifischen Antisinn-Oligonukleotiden (200 nmol/l) und dsRNA Oligonukleotiden (50
10 nmol/l) in die Zelllinie HuH-7 blue ist eine Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität nachweisbar. HCVPT01 reduziert die Aktivität der β -Galaktosidase um 35 % und HCVPT02 um 40 %. Das als Negativkontrolle eingesetzte Oligonukleotid HCVPT03 steigert die Aktivität um 40 % im Vergleich zu unbehandelten
15 Zellen. Die dsRNAs HCV1-2 und GAL1-2 hemmen die β -Galaktosidase-Aktivität mit vergleichbarer Effizienz. Die Aktivität der β -Galaktosidase sinkt jeweils um 37 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die unspezifische Kontrolle K22 steigert die Aktivität um 15 % im Vergleich zu unbehan-
20 delten Zellen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung der Replikation von Viren mit einer am 3'-Ende des Virus-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR),
5 dadurch gekennzeichnet, dass

eine Struktur innerhalb der 3'-UTR unter Verwendung einer
10 kurzen doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) oder eines Antisinn-Oligonukleotids geändert wird, wobei ein Strang S1 der dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid abschnittsweise oder vollständig komplementär zur 3'-UTR-Sequenz der Viren ist.
15 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein die 3'-UTR bildender Sequenzabschnitt geschnitten wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Struktur in
20 einem hochkonservierten Bereich der 3'-UTR geändert wird.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zumindest abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
25 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Ende der dsRNA, vorzugsweise beide Enden, glatt sind.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
30 zumindest ein Strang, insbesondere der Strang S1, der dsRNA am 3'-Ende einen Überhang hat.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Überhang aus 1 bis 3 Nukleotiden, vorzugsweise 2 Nukleotiden, gebildet ist.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein zumindest abschnittsweise zur 3'-UTR-Sequenz komplementärer Bereich der dsRNA weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare umfasst.

5

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA eine Länge von weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare aufweist.

10

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Virus-Genom das Genom eines (+)-Strang-RNA-Virus ist.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der (+)-Strang-RNA-Virus ein Hepatitis-C-Virus ist.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in einer Lösung, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, vorliegt.

20

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsoid umschlossen vorliegt.

25

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA einen Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 und einen Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 oder wobei das Antisinn-Oligonukleotid einen Strang mit der Sequenz SEQ ID NO: 12 oder SEQ ID NO: 13 aufweist.

30

15. Verwendung von kurzen doppelsträngigen Ribonukleinsäuren (dsRNA) oder eines Antisinn-Oligonukleotids zur Hemmung der Replikation von Viren mit einer am 3'-Ende des Virus-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR) durch Ände-

35

rung einer Struktur innerhalb der 3'-UTR, wobei ein Strang S1 der dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid abschnittsweise oder vollständig komplementär zur 3'-UTR-Sequenz der Viren ist.

5

16. Verwendung von kurzen doppelsträngigen Ribonukleinsäuren (dsRNA) oder einer Antisinn-Oligonukleotids zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Replikation von Viren mit einer am 3'-Ende des Virus-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR) durch Änderung einer Struktur innerhalb der 3'-UTR, wobei ein Strang S1 der dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid abschnittsweise oder vollständig komplementär zur 3'-UTR-Sequenz der Viren ist.

17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, wobei ein die 3'-UTR bildender Sequenzabschnitt mittels der dsRNA geschnitten wird oder dessen Schneiden durch die dsRNA bewirkt wird.

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei die 3'-UTR hochkonserviert ist.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei die dsRNA zumindest abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.

25

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, wobei ein Ende der dsRNA, vorzugsweise beide Enden, glatt sind.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 20, wobei zumindest ein Strang, insbesondere des Strangs S1, der dsRNA am 3'-Ende einen Überhang hat.

22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei der Überhang aus 1 bis 3 Nukleotiden, vorzugsweise 2 Nukleotiden, gebildet wird.

35

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 22, wobei ein zumindest abschnittsweise zur 3'-UTR-Sequenz komplementärer Bereich der dsRNA weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare umfasst.

5

24. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 23, wobei die dsRNA eine Länge von weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare aufweist.

10 25. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 24, wobei das Virus-Genom das Genom eines (+)-Sträng-RNA-Virus ist.

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 25, wobei der (+)-Strang-RNA-Virus ein Hepatitis-C-Virus ist.

15

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 26, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion, geeignet ist.

20

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 27, wobei die dsRNA in einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, vorliegt.

25

29. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 28, wobei die dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsoid umschlossen vorliegt.

30

30. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 29, wobei die dsRNA oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenöser oder intraperitonealer Infusion oder Injektion, verabreicht wird.

35

31. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 30, wobei die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, pro kg Körpergewicht pro Tag einem
5 Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.

32. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 31, wobei die dsRNA einen Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 und einen Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 oder wobei das Anti-
10 sinn-Oligonukleotid einen Strang mit der Sequenz SEQ ID NO: 12 oder SEQ ID NO: 13 aufweist.

33. Medikament zur Hemmung der Replikation von Viren mit einer am 3'-Ende des Virus-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR),
15

dadurch gekennzeichnet, dass

zur Änderung der Struktur innerhalb der 3'-UTR eine kurze
20 doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) oder ein Antisinn-Oligonukleotid enthalten ist, wobei ein Strang S1 der dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid abschnittsweise oder vollständig komplementär zur 3'-UTR-Sequenz der Viren ist.

25 34. Medikament nach Anspruch 33, wobei die kurze doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) oder das Antisinn-Oligonukleotid den 3'-UTR bildenden Sequenzabschnitt schneidet oder dessen Schneiden bewirkt.

30 35. Medikament nach Anspruch 33 oder 34, wobei die 3'-UTR hochkonserviert ist.

36. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei die dsRNA zumindest abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet
35 ist.

37. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 36, wobei ein Ende der dsRNA, vorzugsweise beide Enden, glatt sind.
- 5 38. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 37, wobei zumindest ein Strang, insbesondere der Strang S1, der dsRNA am 3'-Ende einen Überhang hat.
39. Medikament nach Anspruch 38, wobei der Überhang aus 1
10 bis 3 Nukleotiden, vorzugsweise 2 Nukleotiden, gebildet ist.
40. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 39, wobei ein zumindest abschnittsweise zur 3'-UTR-Sequenz komplementärer Bereich der dsRNA weniger als 30, vorzugsweise weniger als
15 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare umfasst.
41. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 40, wobei die dsRNA eine Länge von weniger als 30, vorzugsweise weniger als
20 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare aufweist.
42. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 41, wobei das Virus-Genom das Genom eines (+)-Strang-RNA-Virus ist.
43. Medikament nach Anspruch 42, wobei der (+)-Strang-RNA-
25 Virus ein Hepatitis-C-Virus ist.
44. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 43, wobei das Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur
30 intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion, geeignet ist.
45. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 44, wobei die dsRNA in einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, vorliegt.
35

46. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 45, wobei die dsRNA oder das Antisinn-Oligonukleotid von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, oder einem Kapsid umschlossen vorliegt.

47. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 46, wobei die dsRNA pro vorgesehener Verabreichungseinheit in einer Menge enthalten ist, welche einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, ~~besonders bevorzugt höchstens 100 µg,~~ pro kg Körpergewicht entspricht.

48. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 47, wobei die dsRNA einen Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 und einen Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 oder wobei das Antisinn-Oligonukleotid einen Strang mit der Sequenz SEQ ID NO: 12 oder SEQ ID NO: 13 aufweist.

49. Doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) mit einem Strang S1, welcher abschnittsweise oder vollständig zu einer am 3'-Ende eines Virus-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR) komplementär ist.

50. DsRNA nach Anspruch 49, wobei die dsRNA das Schneiden des 3'-UTR bildenden Sequenzabschnitts bewirken kann.

51. DsRNA nach Anspruch 49 oder 50, wobei die 3'-UTR hochkonserviert ist.

30

52. DsRNA nach einem der Ansprüche 49 bis 51, wobei die dsRNA zumindest abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.

53. DsRNA nach einem der Ansprüche 49 bis 52, wobei ein Ende der dsRNA, vorzugsweise beide Enden, glatt sind.
54. DsRNA nach einem der Ansprüche 49 bis 53, wobei zumindest ein Strang, insbesondere der Strang S1, der dsRNA am 3'-Ende einen Überhang hat.
55. DsRNA nach Anspruch 54, wobei der Überhang aus 1 bis 3 Nukleotiden, vorzugsweise 2 Nukleotiden, gebildet ist.
56. DsRNA nach einem der Ansprüche 49 bis 55, wobei ein zumindest abschnittsweise zur 3'-UTR-Sequenz komplementärer Bereich der dsRNA weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare umfasst.
57. DsRNA nach einem der Ansprüche 49 bis 56, wobei die dsRNA eine Länge von weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare aufweist.
58. DsRNA nach einem der Ansprüche 49 bis 57, wobei das Virus-Genom das Genom eines (+)-Strang-RNA-Virus ist.
59. DsRNA nach Anspruch 58, wobei der (+)-Strang-RNA-Virus ein Hepatitis-C-Virus ist.
60. DsRNA nach einem der Ansprüche 49 bis 59, wobei die dsRNA in einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, vorliegt.
61. DsRNA nach einem der Ansprüche 49 bis 60, wobei die dsRNA von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, oder einem Kapsid umschlossen vorliegt.

62. DsRNA nach einem der Ansprüche 49 bis 61, wobei die dsRNA einen Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 und einen Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 aufweist.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Ribopharma AG

5 <120> Verfahren zur Hemmung der Replikation von Viren

<130> 422399

<140>

10 <141>

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

20 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Eine einem Bereich des HCV-Genoms entsprechende DNA-Sequenz

25 <400> 1

gtcacggcta gctgtgaaag gtcc 24

<210> 2

30 <211> 57

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Fusionsgen

<400> 2

gtcaccatgt cgtcacggct agctgtgaaa ggtccagtca ccatgtcggt tactttg 57

40 <210> 3

<211> 56

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

45 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Fusionsgen

<400> 3

50 gtcaccttgt cgtcacggct agctgtgaaa ggtccagtca ccatgtcggt tactttg 57

<210> 4

<211> 23

55 <212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

60 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang einer dsRNA

34

<400> 4
 acggcuagcu gugaaagguc cgu 23

5 <210> 5
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz

10 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Antisinn-Strang einer dsRNA

15 <400> 5
 ggaccuuuca cagcuagccg uga 23

20 <210> 6
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz

25 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang
 einer dsRNA

<400> 6
 gugaaaauuau cgaugagcgu ggu 23

30 <210> 7
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz

35 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Antisinn-Strang einer dsRNA

40 <400> 7
 cacgcucauc gauaauuuc ccg 23

45 <210> 8
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz

50 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang
 einer dsRNA

55 <400> 8
 agacagucga cuucagccug g 21

60 <210> 9
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz

35

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Antisinn-Strang einer dsRNA

5 <400> 9
aggcugaagu cgacugucug g 21

<210> 10
10 <211> 24
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
15 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang
einer dsRNA

<400> 10
20 gaugagggauc guuucgcaug auug 24

<210> 11
<211> 24
<212> RNA
25 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Antisinn-Strang einer dsRNA

30 <400> 11
aucaugcgaac acgauccuca uccu 24

<210> 12
35 <211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
40 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Antisinn-Oligonukleotid

<400> 12
45 ggacctttca cagctagccg t 21

<210> 13
<211> 21
50 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Antisinn-Oligonukleotid

55 <400> 13
cctttcacag ctagccgtga c 21

60 <210> 14

36

<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

5 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Antisinn-Oligonukleotid

10 <400> 14
tgccgatcga cactttccag g 21

<210> 15
<211> 28
15 <212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mittels der
20 Plasmide p2 oder p3 gebildete eine HCV-Sequenz
enthaltende mRNA

<400> 15
25 ucgucacggc uagcugugaa agguccag 28

<210> 16
<211> 25
<212> RNA
30 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Dem
35 β -Gal-Gen entsprechende mRNA.

<400> 16
cggugaaaau aucgaugagc guggu 25

40

GTC ACC ATG TCG TCA CGG CTA GCT GTG AAA GGT CCA GTC ACC ATG TCG TTT ACT TTG
M S S R L A L K G P V T M S F T L

Fig. 1

GTC ACC TTG TCG TCA CGG CTA GCT GTG AAA GGT CCA GTC ACC ATG TCG TTT ACT TTG
M S S R L A L K G P V T M S F T L

Fig. 2

2/6

5'	uc GUC ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC ag	3'	mRNA p2 & p3
5'	ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC GU	3'	Sinn-Strang (HCV 1)
3'	AG UGC CGA UCG ACA CUU UCC AGG	5'	Antisinn-Strang (HCV 2)

Fig. 3

5'	cg GUG AAA UUA UCG AUG AGC GUG gu	3'	mRNA
5'	GUG AAA UUA UCG AUG AGC GUG gu	3'	Sinn-Strang (Gal 1)
3'	gc CAC UUU AAU AGC UAC UCG CAC	5'	Antisinn-Strang (Gal 2)

Fig. 4

5'	AGA CAG UCG ACU UCA GCC Ugg	3'	Sinnstrang (HCV 3)
3'	gg UCU GUC AGC UGA AGU CGG A	5'	Antisinn-Strang (HCV 4)

Fig. 5

3/6

5'	GAU GAG GAU CGU UUC GCA UGA UUG	3'	Sinn-Strang (K18 s)
3'	UC CUA CUC CUA GCA AAG CGU ACU A	5'	Antisinn-Strang (K17 as)

FIG. 6

5'	uc GUC ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC ag	3'	mRNA p3 (HCV Sequenz)
3'	TGC CGA TCG ACA CTT TCC AGG	5'	HCVPT01
3'	CAG TGC CGA TCG ACA CTT TCC	5'	HCVPT02
3'	GGA CCT TTC ACA GCT AGC CGT	5'	HCVPT03

Fig. 7

4/6

Wirkung von dsRNA auf die Expression von β -Galaktosidase
mittels des Plasmids p2

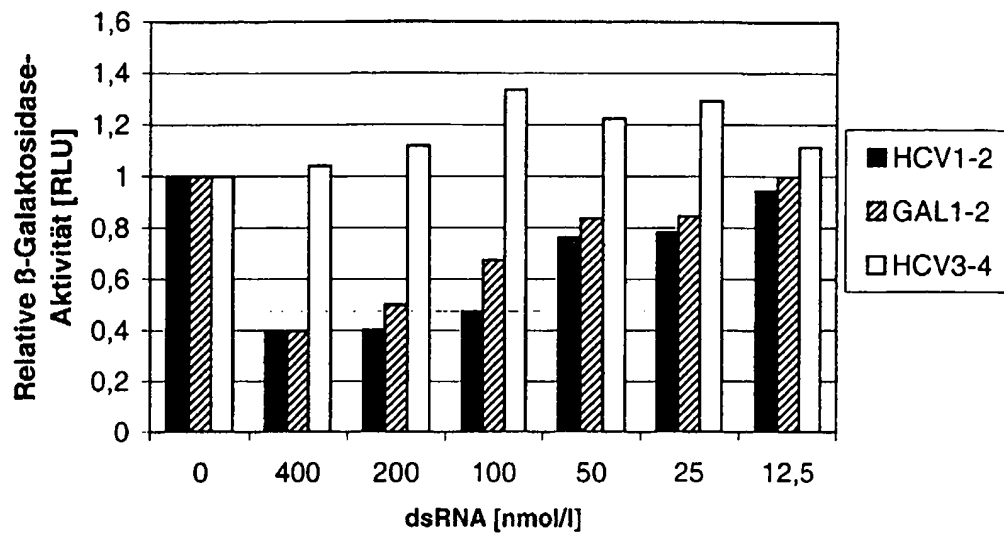
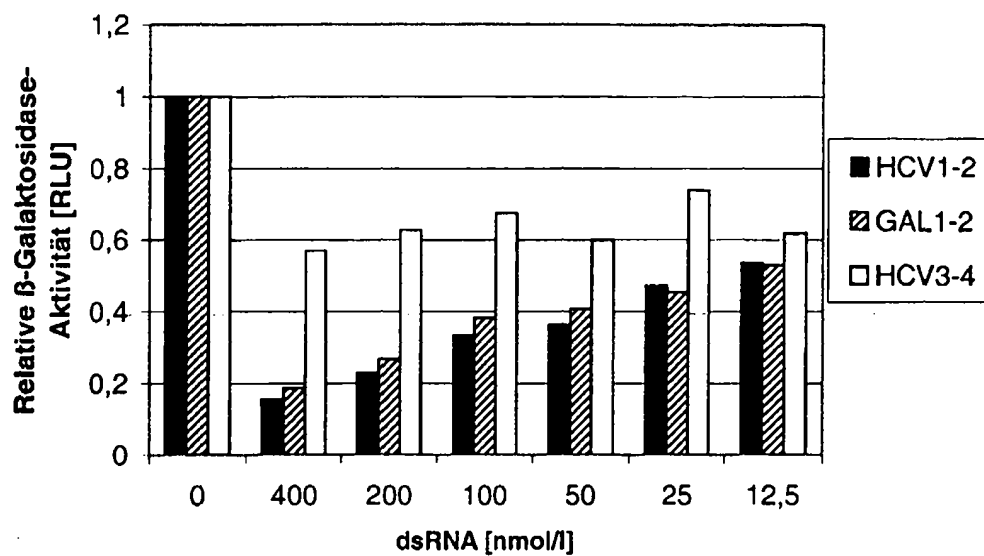


Fig. 8

5/6

**Wirkung von dsRNA auf die Expression von β -Galaktosidase
mittels des Plasmids p3**

**Fig. 9**

6/6

Wirkung von Antisinn- und dsRNA-Oligonukleotiden auf die
Expression von β -Galaktosidase mittels des Plasmids p3

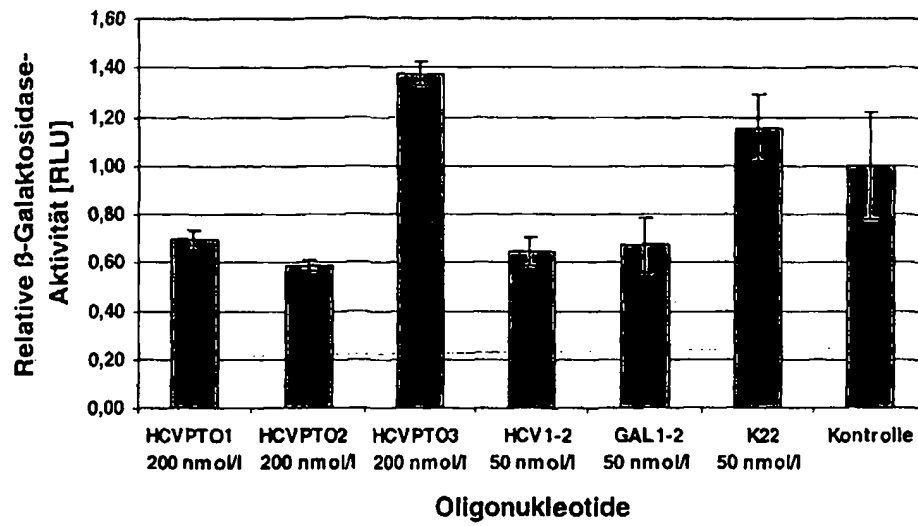


Fig.10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/11432

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/88 C07K14/18 C07K14/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 02 055693 A (RIBOPHARMA AG ;ROST SYLVIA (DE); KREUTZER ROLAND (DE); LIMMER STEP) 18 July 2002 (2002-07-18) the whole document	1-62
Y	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ;LIMMER STEPHAN (DE)) 3 August 2000 (2000-08-03) the whole document	1-62
Y	WO 00 44914 A (FARRELL MICHAEL J ;LI YIN XIONG (US); KIRBY MARGARET L (US); MEDIC) 3 August 2000 (2000-08-03) Claim 50 the whole document	1-62

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 2003

Date of mailing of the international search report

13/03/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Armandola, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/11432

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ;MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW () 1 July 1999 (1999-07-01) the whole document ---	1-62
Y	WANG A ET AL: "Specific inhibition of coxsackievirus B3 translation and replication by phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. UNITED STATES APR 2001, vol. 45, no. 4, April 2001 (2001-04), pages 1043-1052, XP002231044 ISSN: 0066-4804 the whole document ---	1-62
Y	STRICKLAND S ET AL: "ANTISENSE RNA DIRECTED AGAINST THE 3' NONCODING REGION PREVENTS DORMANT MRNA ACTIVATION IN MOUSE OOCYTES" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 241, 1988, pages 680-684, XP000910256 ISSN: 0036-8075 the whole document ---	1-62
Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INST TE) 11 October 2001 (2001-10-11) the whole document ---	5-9, 12, 13, 20-24, 27-30, 37-41, 44-46, 53-57, 60-62
P, Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6 June 2002 (2002-06-06) the whole document ---	5-9, 12, 13, 20-24, 27-30, 37-41, 44-46, 53-57, 60-62

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/11432

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 101, no. 1, 31 March 2000 (2000-03-31), pages 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 the whole document	5-9,12, 13, 20-24, 27-30, 37-41, 44-46, 53-57, 60-62
Y	MUOTRI A R ET AL: "Ribozymes and the anti-gene therapy: how a catalytic RNA can be used to inhibit gene function" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 237, no. 2, 17 September 1999 (1999-09-17), pages 303-310, XP004183523 ISSN: 0378-1119 the whole document	1-13, 15-31, 33-47, 49-62
Y	JACQUE JEAN-MARC ET AL: "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference." NATURE. ENGLAND 25 JUL 2002, vol. 418, no. 6896, 25 July 2002 (2002-07-25), pages 435-438, XP002232889 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-10,12, 13, 15-25, 27-31, 33-41, 44-47, 49-57, 60-62
Y	PASQUINELLI A E ET AL: "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." NATURE. ENGLAND 2 NOV 2000, vol. 408, no. 6808, 2 November 2000 (2000-11-02), pages 86-89, XP002232888 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-9,12, 13, 15-25, 27-31, 33-41, 44-47, 49-57, 60-62
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 101, no. 3, 28 April 2000 (2000-04-28), pages 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 the whole document	8,9,23, 24,40, 41,56,57

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/11432

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, vol. 15, no. 2, 15 January 2001 (2001-01-15), pages 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369 the whole document ---	8,9,23, 24,40, 41,56,57
P,Y	BITKO V ET AL: "Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses." BMC MICROBIOLOGY 'ELECTRONIC RESOURCE!'. ENGLAND 2001, vol. 1, no. 1, 2001, page 34 XP002232991 ISSN: 1471-2180 the whole document ---	1-62
A	SARVER N ET AL: "RIBOZYMES AS POTENTIAL ANTI-HIV-1 THERAPEUTIC AGENTS" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 247, 1990, pages 1222-1225, XP000652038 ISSN: 0036-8075 ---	
A	PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference" MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 6, no. 5, November 2000 (2000-11), pages 1077-1087, XP002226298 ISSN: 1097-2765 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/11432

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02055693	A	18-07-2002	DE 10100586 C1 WO 02055692 A2 WO 02055693 A2	11-04-2002 18-07-2002 18-07-2002
WO 0044895	A	03-08-2000	DE 19956568 A1 AT 222953 T AU 3271300 A CA 2359180 A1 WO 0044895 A1 DE 10080167 D2 DE 50000414 D1 EP 1144623 A1 EP 1214945 A2 JP 2003502012 T	17-08-2000 15-09-2002 18-08-2000 03-08-2000 03-08-2000 28-02-2002 02-10-2002 17-10-2001 19-06-2002 21-01-2003
WO 0044914	A	03-08-2000	AU 2634800 A CA 2361201 A1 EP 1147204 A1 WO 0044914 A1 US 2002114784 A1	18-08-2000 03-08-2000 24-10-2001 03-08-2000 22-08-2002
WO 9932619	A	01-07-1999	US 6506559 B1 AU 743798 B2 AU 1938099 A CA 2311999 A1 EP 1042462 A1 JP 2002516062 T WO 9932619 A1	14-01-2003 07-02-2002 12-07-1999 01-07-1999 11-10-2000 04-06-2002 01-07-1999
WO 0175164	A	11-10-2001	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002
WO 0244321	A	06-06-2002	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/11432

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/88 C07K14/18 C07K14/82		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 02 055693 A (RIBOPHARMA AG ; ROST SYLVIA (DE); KREUTZER ROLAND (DE); LIMMER STEP) 18. Juli 2002 (2002-07-18) das ganze Dokument	1-62
Y	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ; LIMMER STEPHAN (DE)) 3. August 2000 (2000-08-03) das ganze Dokument	1-62
Y	WO 00 44914 A (FARRELL MICHAEL J ; LI YIN XIONG (US); KIRBY MARGARET L (US); MEDIC) 3. August 2000 (2000-08-03) Claim 50 das ganze Dokument	1-62
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : * A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist * E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist * L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) * O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht * P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist * T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist * X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden * Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist * A* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 27. Februar 2003		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 13/03/2003
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Armandola, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/11432

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ;MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW () 1. Juli 1999 (1999-07-01) das ganze Dokument ---	1-62
Y	WANG A ET AL: "Specific inhibition of coxsackievirus B3 translation and replication by phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. UNITED STATES APR 2001, Bd. 45, Nr. 4, April 2001 (2001-04), Seiten 1043-1052, XP002231044 ISSN: 0066-4804 das ganze Dokument ---	1-62
Y	STRICKLAND S ET AL: "ANTISENSE RNA DIRECTED AGAINST THE 3' NONCODING REGION PREVENTS DORMANT MRNA ACTIVATION IN MOUSE OOCYTES" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, Bd. 241, 1988, Seiten 680-684, XP000910256 ISSN: 0036-8075 das ganze Dokument ---	1-62
Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INST TE) 11. Oktober 2001 (2001-10-11) das ganze Dokument ---	5-9,12, 13, 20-24, 27-30, 37-41, 44-46, 53-57, 60-62
P,Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6. Juni 2002 (2002-06-06) das ganze Dokument ---	5-9,12, 13, 20-24, 27-30, 37-41, 44-46, 53-57, 60-62

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/11432

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, Bd. 101, Nr. 1, 31. März 2000 (2000-03-31), Seiten 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument ---	5-9,12, 13, 20-24, 27-30, 37-41, 44-46, 53-57, 60-62
Y	MUOTRI A R ET AL: "Ribozymes and the anti-gene therapy: how a catalytic RNA can be used to inhibit gene function" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, Bd. 237, Nr. 2, 17. September 1999 (1999-09-17), Seiten 303-310, XP004183523 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument ---	1-13, 15-31, 33-47, 49-62
Y	JACQUE JEAN-MARC ET AL: "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference." NATURE. ENGLAND 25 JUL 2002, Bd. 418, Nr. 6896, 25. Juli 2002 (2002-07-25), Seiten 435-438, XP002232889 ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument ---	1-10,12, 13, 15-25, 27-31, 33-41, 44-47, 49-57, 60-62
Y	PASQUINELLI A E ET AL: "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." NATURE. ENGLAND 2 NOV 2000, Bd. 408, Nr. 6808, 2. November 2000 (2000-11-02), Seiten 86-89, XP002232888 ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument ---	1-9,12, 13, 15-25, 27-31, 33-41, 44-47, 49-57, 60-62
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, Bd. 101, Nr. 3, 28. April 2000 (2000-04-28), Seiten 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument ---	8,9,23, 24,40, 41,56,57

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen

PCT/EP 02/11432

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, Bd. 15, Nr. 2, 15. Januar 2001 (2001-01-15), Seiten 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369 das ganze Dokument	8,9,23, 24,40, 41,56,57
P,Y	BITKO V ET AL: "Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses." BMC MICROBIOLOGY 'ELECTRONIC RESOURCE!'. ENGLAND 2001, Bd. 1, Nr. 1, 2001, Seite 34 XP002232991 ISSN: 1471-2180 das ganze Dokument	1-62
A	SARVER N ET AL: "RIBOZYMES AS POTENTIAL ANTI-HIV-1 THERAPEUTIC AGENTS" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 247, 1990, Seiten 1222-1225, XP000652038 ISSN: 0036-8075	
A	PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference" MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 6, Nr. 5, November 2000 (2000-11), Seiten 1077-1087, XP002226298 ISSN: 1097-2765	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Abkürzungszeichen

PCT/EP 02/11432

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02055693 A	18-07-2002	DE 10100586 C1 WO 02055692 A2 WO 02055693 A2	11-04-2002 18-07-2002 18-07-2002
WO 0044895 A	03-08-2000	DE 19956568 A1 AT 222953 T AU 3271300 A CA 2359180 A1 WO 0044895 A1 DE 10080167 D2 DE 50000414 D1 EP 1144623 A1 EP 1214945 A2 JP 2003502012 T	17-08-2000 15-09-2002 18-08-2000 03-08-2000 03-08-2000 28-02-2002 02-10-2002 17-10-2001 19-06-2002 21-01-2003
WO 0044914 A	03-08-2000	AU 2634800 A CA 2361201 A1 EP 1147204 A1 WO 0044914 A1 US 2002114784 A1	18-08-2000 03-08-2000 24-10-2001 03-08-2000 22-08-2002
WO 9932619 A	01-07-1999	US 6506559 B1 AU 743798 B2 AU 1938099 A CA 2311999 A1 EP 1042462 A1 JP 2002516062 T WO 9932619 A1	14-01-2003 07-02-2002 12-07-1999 01-07-1999 11-10-2000 04-06-2002 01-07-1999
WO 0175164 A	11-10-2001	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002
WO 0244321 A	06-06-2002	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002